**乳酸脱氢酶(LDH)试剂盒说明书（货号：PYB2055，规格：96T）**

1. **实验原理：** 乳酸  LDH 丙酮酸

丙酮酸+2,4 二硝基苯肼 37℃温浴+碱 丙酮酸二硝基苯腙（红棕色），根据比尔定律，可测乳酸脱氢酶（LDH）活性。

1. **试剂组份**：

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | **组分** | **PYB205596T** | **保存** |
| **试剂一** | 基质缓冲液 | 5mL×1瓶 | 2-8℃ |
| **试剂二** | 辅酶Ⅰ | 粉剂×1支 | -20℃ |
| 辅酶Ⅰ溶液配制：使用前每支粉剂加1.3mL双蒸水溶解，溶解后冷冻可保存2周，如需多次使用建议分装冷冻（防止反复冻融）(注:辅酶Ⅰ粉剂量较少,可能附着于管壁或盖子上,并非空管,如使用时肉眼不可见,可将其4000转/分钟离心2分钟后使用) | | |
| **试剂三** | 2，4-二硝基苯肼 | 5mL×1瓶 | 2-8℃避光 |
| **试剂四** | 4mol/LNaOH | 5mL×1瓶 | 2-8℃ |
| 0.4mol/LNaOH溶液配制：将4mol/LNaOH溶液用双蒸水10倍稀释，需多少配多少 | | |
| **试剂五** | 2umol/ml  丙酮酸钠标准液 | 1ml×1支 | 2-8℃ |
| 0.2μmol/mL丙酮酸钠标准液配制：取2μmol/mL丙酮酸钠标准液用双蒸水10倍稀释，现用现配 | | |

参考样本浓度：小鼠脑组织匀浆一般稀释成0.01%浓度测，人血清一般10倍稀释后测（以上浓度仅供参考,以具体样本值为准）。若样本中LDH酶活力太高，可将样本用生理盐水稀释后再测。注：1、对照孔中不加试剂二(辅酶I)。2、严格按照说明书操作，不可先加辅酶I再加基质液。

测试所需仪器和试剂：

含440nm波长的酶标仪及96孔板（附送一块）、37℃水浴锅或恒温箱、台式低速离心机、各种规格移液器、烧杯或试剂瓶（用于配制 0.4M氢氧化钠，空试剂瓶本公司有售）、双蒸水、生理盐水（0.9%）或PBS（0.1M）、涡旋混匀器、蛋白测定试剂。

（二）、操作表

A测定-A对照

血清（浆）等液体样本乳酸脱氢酶定义及计算公式：LDH活性（U/L）= × C标准×N×1000

A测定-A空白

定义：每升样本37℃与基质作用15分钟，在反应体系中产生1µmol丙酮酸为1单位。N：样本测试前稀释倍数；C标准:标准液浓度,0.2μmol/mL;1000:单位换算，mL→L；

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  | **空白孔** | **标准孔** | **测定孔** | **对照孔** |
| 双蒸水（ul） | 20 | 4 |  | 4 |
| 0.2μmol/mL  丙酮酸钠标准液(µL) |  | 16 |  |  |
| 待测样本(µL) |  |  | 16 | 16 |
| 试剂一(µL) | 20 | 20 | 20 | 20 |
| 试剂二(µL) |  |  | 4 |  |
| 轻轻振荡孔板混匀，37℃温浴15分钟 | | | | |
| 试剂三(µL) | 20 | 20 | 20 | 20 |
| 轻轻振荡孔板混匀，37℃温浴15分钟 | | | | |
| 试剂四（ul） | 200 | 200 | 200 | 200 |
| 轻轻振荡孔板混匀，室温放置5分钟，波长440nm，酶标仪测定吸光度值。 | | | | |

组织、细胞样本乳酸脱氢酶定义及计算公式：

定义：样本中每克蛋白对应的酶量在37℃与基质作用15分钟，使反应体系中产生1µmol丙酮酸为1单位。

计算公式：

A测定-A对照

组织细胞中LDH活性（U/gprot）=

A标准-A空白

×C标准÷Cpr，C标准:标准液浓度,0.2μmol/mL; **Cpr:**样本蛋白浓度，gprot/mL（prot指蛋白）。

**三、使用步骤：**

（一）、样本前处理：血清(浆)等液体样本：直接使用。

细胞培养液：吸取部分4000转/分离心5分钟，取上清检测。

细胞样本：收集细胞后，每份细胞（细胞数量尽量不要低于106个，越多越好）加入0.3mL的生理盐水（或者PBS），冰水浴下超声破碎（功率200-300W，运行5秒，间隔15秒，反复3-5次），4000转/分离心10分钟，取上清液（上清液需要测定其蛋白浓度，蛋白测定试剂盒本公司有售）待测。

动物组织样本：准确称取组织重量,按重量(g):体积(mL)=1:9的比例,加入9倍体积的生理盐水,冰水浴条件下机械匀浆,4000转/分,离心10分钟,取上清液（上清液需要测定其蛋白浓度，蛋白测定试剂盒本公司有售）待测。

植物组织样本：方法一是先将植物组织用PBS擦洗干净，再用吸水纸吸干，后剪碎放入研钵中，液氮研磨成粉，称取植物粉末，按重量(g):体积(mL)=1:9的比例,加入9倍体积的PBS，涡旋震荡（或研磨仪研磨）1分钟，4000转/分,离心10分钟,取上清液待测；方法二是在洗净并擦干水分后，直接称重，按重量(g):体积(mL)=1:9的比例,加入9倍体积的PBS，冰水浴条件下机械匀浆,4000转/分,离心10分钟,取上清液待测。（注：一般水分含量较高的植物用方法二来处理，相反水分含量低或者干样推荐用方法一处理）

注意事项：

1于加样量比较少，建议：①加样时左手稳住加样枪；②将吸头靠近酶标孔底部，缓慢加样，边加边将吸头上移，以保证吸头上样本残留量最少。

2.加试剂时需要注意，速度不宜太快，以免溅出酶标孔。

3.酶标孔比较小，所以混匀力度要适中，使用摇床或手动混匀时，动作不宜太过剧烈，以免液体溅出，太慢则混匀不充分；先将孔壁上的液体轻轻的震动落下，再前后、左右的摇动。

4.酶标板可能存在初始吸光度的差异，最好在使用前先在相应的波长处测定其初始吸光度，记录下差异，然后再加样测定。

5.辅酶I加样量比较少，所以加入时尽量靠近孔底液面处,这样加完后轻轻振荡孔板就能使其与底部液体接触。

6.加样时要尽量避免产生气泡。倘若有气泡，须将气泡破碎后再进行读数。

7.本试剂盒仅用于科研、实验室。

8.96孔板可自备,如自备的孔板每孔容量低于260μL，可先在离心管中反应完再吸取200μL加入到孔板中读数。

Ⅰ ：标准曲线制备（可不做）

**1**、 操作：

将 2µmol/mL 的丙酮酸钠标准液用双蒸水分别稀释 200倍、 100 倍、 50 倍、 20 倍、 10 倍、 5 倍、 2 倍后按照操作表标准孔操作制作标准曲线。

**2**、绘图如下：

以吸光度为纵坐标，以标准品浓度为横坐标，绘制标准曲线:

Ⅱ ：大鼠血浆 **LDH** 取样浓度摸索

**1**、 样本： 大鼠血浆。

**2**、 将大鼠血浆稀释不同倍数后按操作表操作（ 将原大鼠血浆浓度视为 1， 则 100 倍稀释后浓度视为 0.01，以此类推其他相应浓度）

**3**、测定结果：

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 稀释倍数 |  |  |  |  |  |  |
| 测定 OD |  |  |  |  |  |  |
| 对照 OD |  |  |  |  |  |  |
| 绝对 OD |  |  |  |  |  |  |

参考取样浓度：大鼠血浆为 50～100 倍稀释。在其范围内酶曲线通过回归曲线的处理，相对成正比关系。（若稀释浓度过大或过少，则在实验结束后，在进行统计学处理时会出现无显著差异

Ⅲ：大鼠肾匀浆 **LDH** 取样浓度摸索:

**1**、样本： 正常组大鼠肾组织

**2**、前处理：

大鼠肾组织取出后用生理盐水制成 10%的匀浆上清液（具体见实验方法学），用生理盐水 10 倍稀释成 1%后再用生理盐水分别稀释成不同的浓度： 0.01%、 0.02%、 0.05%、 0.1%、 0.2%、 0.5%，稀释完按操作表进行操作。同时用 0.5%的肾组织匀浆液用于蛋白定量（考马斯亮蓝法测定蛋白，本公司有售）。

**3**、结果：

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 样本浓度 |  |  |  |  |  |  |
| 测定 OD |  |  |  |  |  |  |
| 对照 OD |  |  |  |  |  |  |
| 绝对 OD |  |  |  |  |  |  |